

## 利用ACQUITY UPLC H-Class系统结合PDA检测器对石榴假种皮果汁、果皮和市售果汁中的水溶性维生素和黄酮类化合物进行定性和定量分析

Dilshad Pullancheri<sup>1</sup>、Gopal Vaidyanathan<sup>1</sup> and N. Gayathree<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 沃特世印度公司（印度班加罗尔）

<sup>2</sup> 国家葡萄研究中心（印度普纳）

### 应用优势

- 与传统的HPLC系统相比，ACQUITY UPLC® H-Class系统简单易用、操作方便。
- ACQUITY UPLC H-Class SmartStart技术能够自动化并行管理梯度起始时间和预进样步骤。通过重叠这些典型连续过程，使循环时间最小化，有助于开发运行时间更短的分析方法。
- 研究表明石榴皮提取物具有双重抗氧化性，可在食品应用中作为生物防腐剂，也可用作营养制品。

### 简介

石榴 (*Punica granatum L.*; 在古埃及称为*inhmn*) 生长于亚洲西南部，在地中海沿岸国家均有栽培。石榴是落叶灌木或花朵为绯红色且带香味的树木，然后长成质地坚硬略带微黄或微红的果实，果实中含有鲜红色的种子。

在印度次大陆的不同地区，至少种植有14个不同品种的石榴，其中包括Arakta、Dholka、G 137、Ganesh、Jyoti、Kabul、Kandhari、Mrudula、Muskat、P23、P26和Ruby<sup>1</sup>。

据报道，石榴中维生素含量“相当惊人”<sup>2</sup>，因此，它一直位于富含维生素的水果名单之首<sup>2</sup>。

在本应用资料中，我们对石榴的假种皮果汁、果皮和市售果汁中的水溶性维生素如抗坏血酸、硫胺素、核黄素、氰钴胺及槲皮素黄酮类化合物进行了比较和定量研究。采用ACQUITY UPLC H-Class系统结合PDA检测器进行方法开发，然后利用此方法进行快速常规分析。

目标化合物	类别	保健功效
抗坏血酸 (维生素C)	维生素	每天摄入维生素C有助于预防皮肤出现皱纹，增强免疫系统。
硫胺素 (维生素B <sub>1</sub> )	维生素	机体正常功能所必需的维生素，可确保体内正常代谢速率并能够促进细胞生长。
核黄素 (维生素B <sub>2</sub> )	维生素	机体正常功能所必需的维生素，可确保体内正常代谢速率并能够促进细胞生长。
氰钴胺 (维生素B <sub>12</sub> )	维生素	对大脑和神经系统的功能具有重要作用，还影响血液的形成。
槲皮素	黄酮类化合物	具有预防癌症的作用。

表1. 各种维生素和黄酮类化合物的保健功效<sup>3</sup>。

### 沃特世解决方案

ACQUITY UPLC H-Class系统

ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱

ACQUITY UPLC PDA检测器

### 关键词

维生素，黄酮类化合物，果汁，UPLC，UV

## 实验

### 样品制备

将市售果汁和鲜榨果汁以13000 rpm离心10 min, 用0.22  $\mu\text{m}$ 过滤器过滤上清液。将所得溶液直接进样分析。

取石榴皮, 晒干并磨成粉末。称取石榴皮粉末适量, 用相当于粉末称样量的5至7倍的甲醇浸泡48 h。将上述溶液用Whatman 41号滤纸过滤, 以13000 rpm离心10 min, 取上清液并用0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 然后直接进样。

### UPLC条件

UPLC系统:	ACQUITY UPLC H-CLASS	梯度:				
色谱柱:	ACQUITY UPLC	时间 (min)	%A	%B	曲线	
	HSS T3 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 $\mu\text{m}$	0.00	98	02	初始	
流动相A:	0.1%甲酸水溶液	0.99	95	05	6	
流动相B:	含0.1%甲酸的甲醇	2.39	80	20	6	
流速:	0.4 mL/min	4.89	45	55	6	
柱温:	35 $^{\circ}\text{C}$	4.99	02	98	6	
样品温度:	4 $^{\circ}\text{C}$	6.89	98	02	6	
洗针液:	5:1:1乙腈/异丙醇 /甲醇 (500 $\mu\text{L}$ )	12.00	98	02	6	
循环时间:	12 min	检测器:				
进样体积:	2 $\mu\text{L}$	ACQUITY UPLC PDA				
注射器吸取速度:	标准-自动 样品-10 $\mu\text{L}/\text{min}$	波长范围:				
		210-400 nm				
<b>提取</b>						
		波长:	270 nm和360 nm			
		分辨率:	1.2 nm			
		滤波器响应:	0.1 s			
		采样速率:	20点/秒			
		曝光时间:	自动			

## 结果与讨论

所有数据均在210-400 nm波长范围内采集，在270 nm波长处进行处理（氰钴胺为360 nm）。

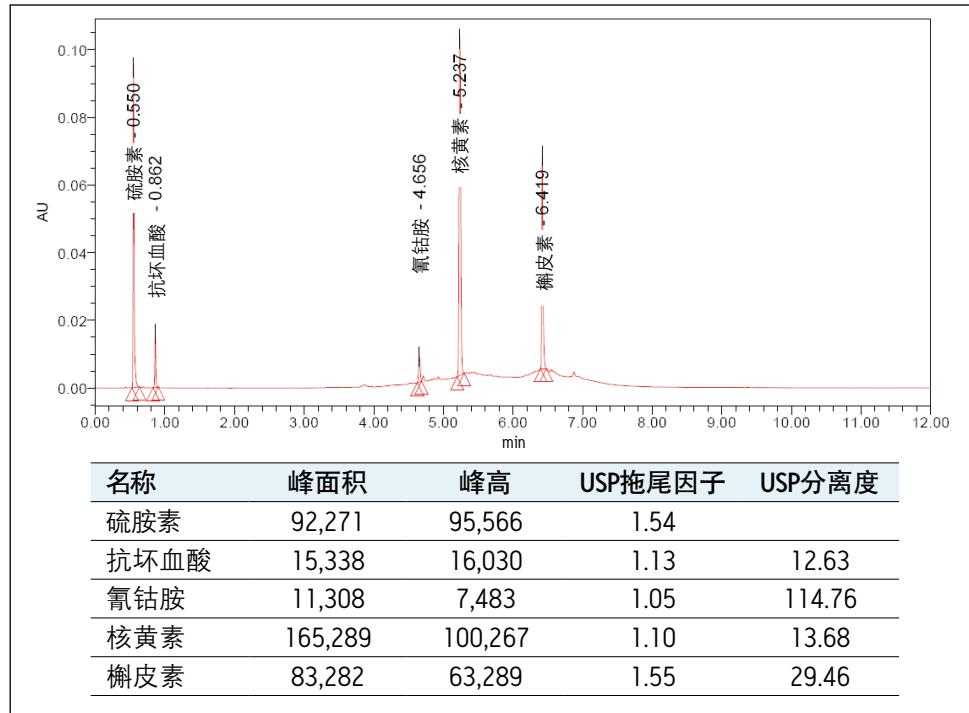


图1. 硫胺素、抗坏血酸、氰钴胺、核黄素和槲皮素标准品的参比混合物。

利用UPLC<sup>®</sup>技术开发一种梯度方法，得到上述分析标准品的色谱分离度。ACQUITY UPLC H-Class系统可提供高分离度色谱，能获得更尖锐的峰形。

利用ACQUITY UPLC PDA检测器记录各个标准品的谱图。配制抗坏血酸、硫胺素、核黄素、氰钴胺和槲皮素标准品的参比混合物，并进样分析以考察方法重现性。

根据定性分析结果，发现在石榴皮和市售石榴汁中只存在两种组分—抗坏血酸和槲皮素。

化合物名称	含量 (石榴果实)*		线性范围 (ppm)
	mg/mL	ppm	
抗坏血酸	0.102	102	12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0
槲皮素	0.002-0.01	2-10	1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0
核黄素	165,289	100,267	1.10
槲皮素	83,282	63,289	1.55

\* (根据美国FDA营养成分数据库10, 2010年)。

表2. 用于绘制线性图的各标准品浓度。

# [应用纪要]

为了进行定量分析，根据文献调查和预期的抗坏血酸<sup>4</sup>和槲皮素<sup>5</sup>浓度绘制标准曲线图。

绘制各线性点，对分析样品中已确定存在的化合物抗坏血酸和槲皮素进行定量。

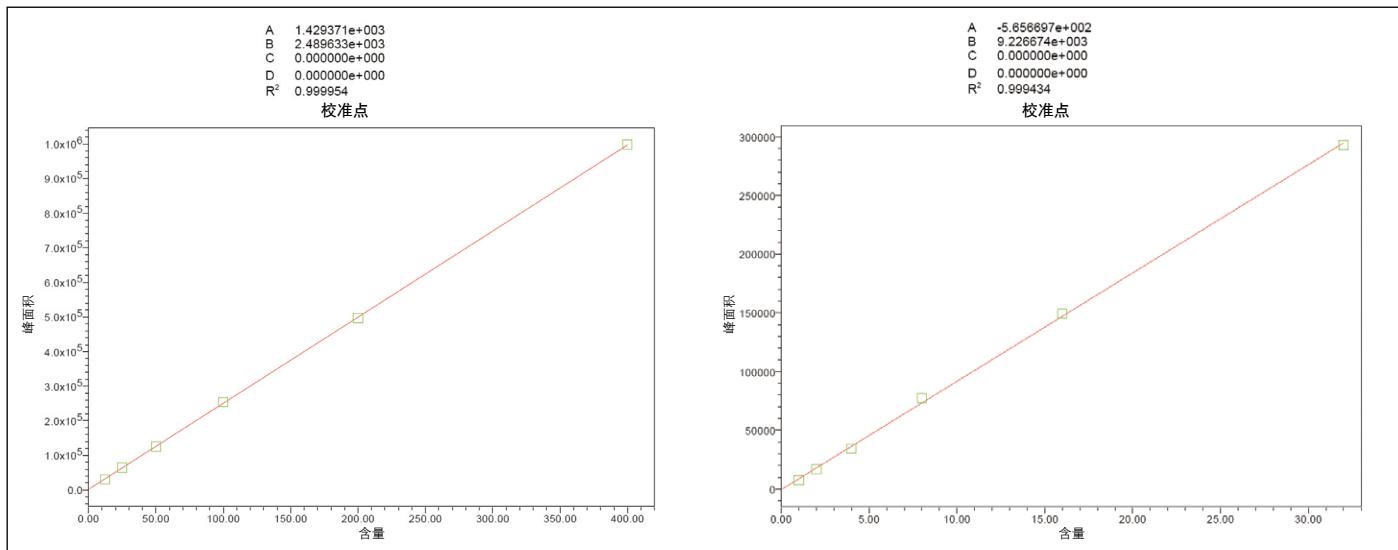


图2. 本研究中发现的两种主要化合物抗坏血酸和槲皮素的校准曲线。

利用上述线性关系对三类不同样品的未知含量被测物进行定量分析，结果如表3所示。

样品类型	硫胺素	抗坏血酸	氰钴胺	核黄素	槲皮素
市售果汁	-	103.53 μg/mL	-	-	0.510 μg/mL
果皮	-	58.23 μg/mL	-	-	16.58 μg/mL
鲜榨果汁 (用石榴果实制备)	-	-	-	-	-

表3. 三份样品中维生素和多酚类物质的含量。

## [应用纪要]

### 利乐包果汁

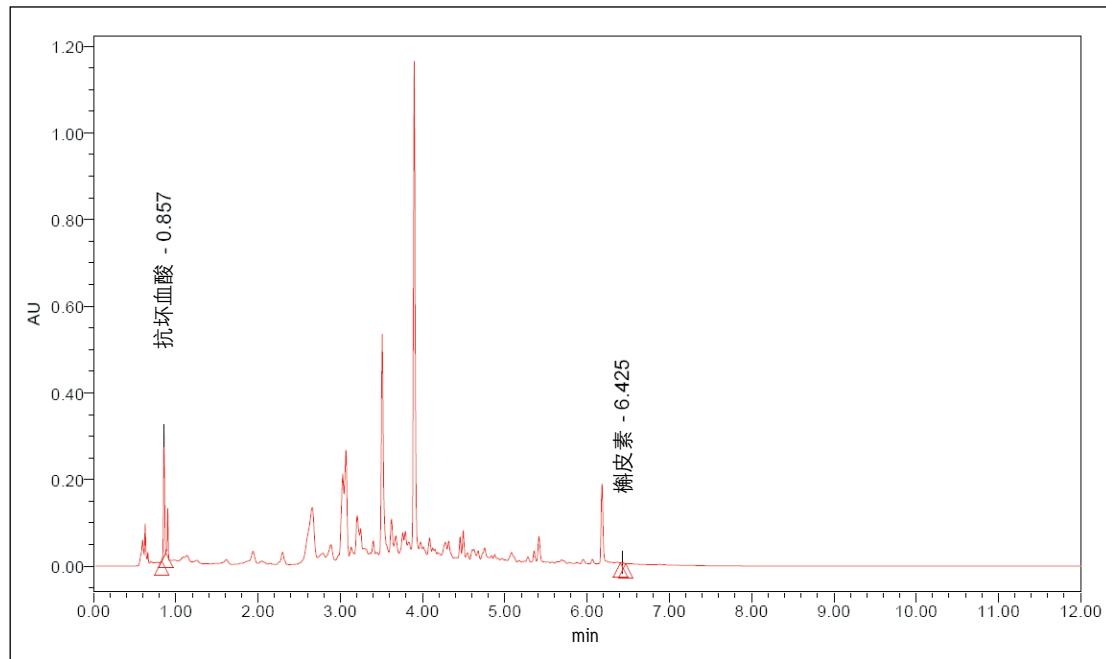


图3. 利乐包果汁的色谱图。

### 石榴皮

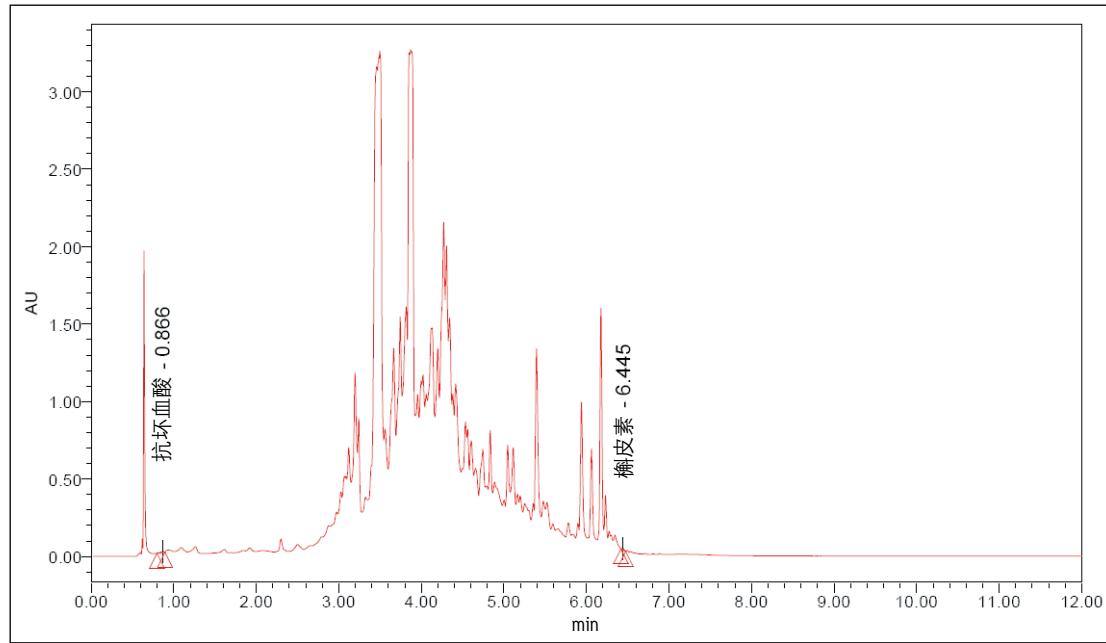


图4. 石榴皮的色谱图。

石榴皮中抗坏血酸和槲皮素的含量分别为 $58.23 \mu\text{g/mL}$ 和 $16.58 \mu\text{g/mL}$ 。采用本方法在样品中未检出其它化合物—硫胺素、氰钴胺和核黄素。

## 鲜榨果汁

如图5的色谱图所示，在鲜榨果汁中，抗坏血酸、氰钴胺、核黄素和槲皮素等化合物均未检出。据观察，利乐包果汁和石榴皮中含有抗坏血酸和槲皮素。

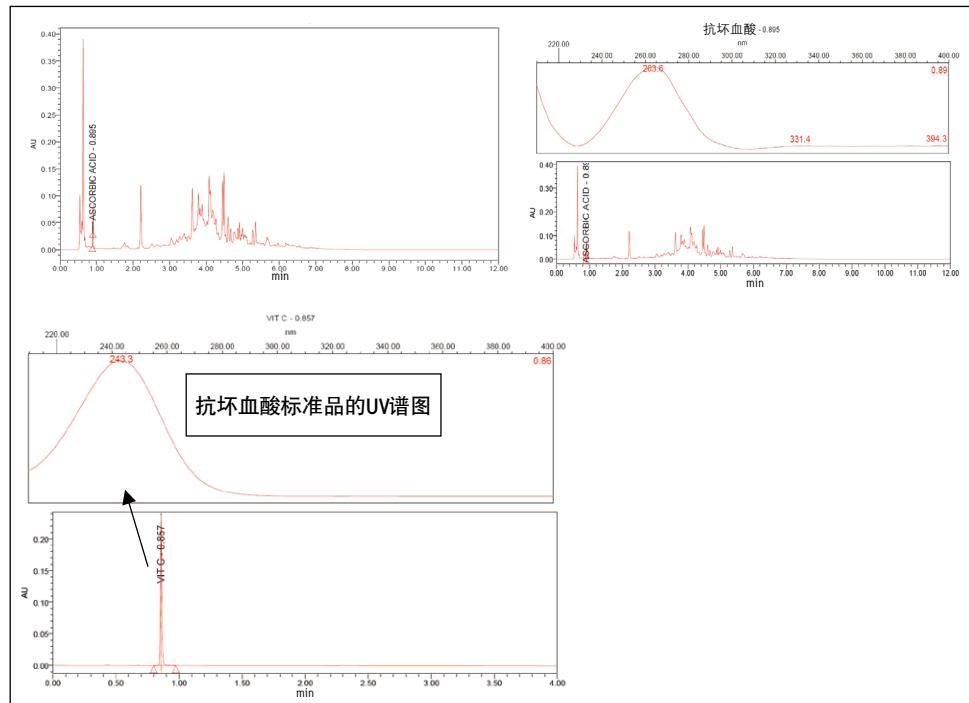


图5. 在抗坏血酸预计保留时间处有峰洗脱的石榴汁色谱图和UV谱图，以及抗坏血酸标准品的UV谱图。所示UV谱图确证该峰不是抗坏血酸。

如图5所示，鲜榨果汁的色谱图显示在抗坏血酸保留时间处出现一个峰。可利用PDA检测器在所有波长下采集的数据来确证该色谱峰是否为抗坏血酸。通过对果汁的谱图进行查看，结果明显表明该色谱峰与抗坏血酸标准品的谱图不匹配。因此，我们可以确定该样品不含抗坏血酸。

鲜榨果汁与富含10 mg抗坏血酸/100 mL果汁的市售石榴汁的对比研究表明，这两种样品中抗坏血酸含量有所不同。这项研究还表明，新鲜水果中不一定富含诸如维生素和黄酮类化合物等必需的营养成分。它们可能会发生自然变异（例如，因采收时间或季节变化而发生的结果），或者为提高营养价值而进行了富集。

所得定量结果如下：

- 在假种皮果汁中未检出抗坏血酸或槲皮素，但石榴皮中含有这两种组分。
- 利乐包果汁中含有抗坏血酸和槲皮素。

这与利乐包果汁生产商在产品标签上所宣称的产品富含抗坏血酸相一致，但未在标签中说明果汁中含有槲皮素。

# [应用纪要]

## 结论

利用UPLC技术和亚2 μm颗粒色谱柱分析石榴Ganesh变种表明，石榴皮提取物具有双重抗氧化性，可在食品应用中作为生物防腐剂，也可以用作营养制品。

## 参考文献

1. 网络参考资料: [http://nhb.gov.in/report\\_files/pomegranate/POMEGRANATE.htm](http://nhb.gov.in/report_files/pomegranate/POMEGRANATE.htm)
2. J Nicks. Pomegranate Fruit Facts. 2010.
3. 网络参考资料: <http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin>
4. 网络参考资料: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2375>
5. N P Seeram, R N Schulman, D Heber. Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine. 2006.



**Waters**  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、ACQUITY UPLC、UPLC和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013年沃特世公司。印制于中国  
2013年3月 720004644ZH AG-PDF

**沃特世中国有限公司**  
**沃特世科技（上海）有限公司**

北京: 010 - 5209 3866  
上海: 021 - 6156 2666  
广州: 020 - 2829 6555  
成都: 028 - 6554 5999  
香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676  
[www.waters.com](http://www.waters.com)